

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 15 日 (15.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/030702 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 48/00, 38/00, A61P 27/16  
 (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012674  
 (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 2 日 (02.10.2003)  
 (25) 国際出願の言語: 日本語  
 (26) 国際公開の言語: 日本語  
 (30) 優先権データ:  
 特願2002-289639 2002 年 10 月 2 日 (02.10.2002) JP  
 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アンジェ  
 ス エムジー株式会社 (ANGES MG, INC.) [JP/JP]; 〒  
 560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町一丁目四番二号  
 Osaka (JP).

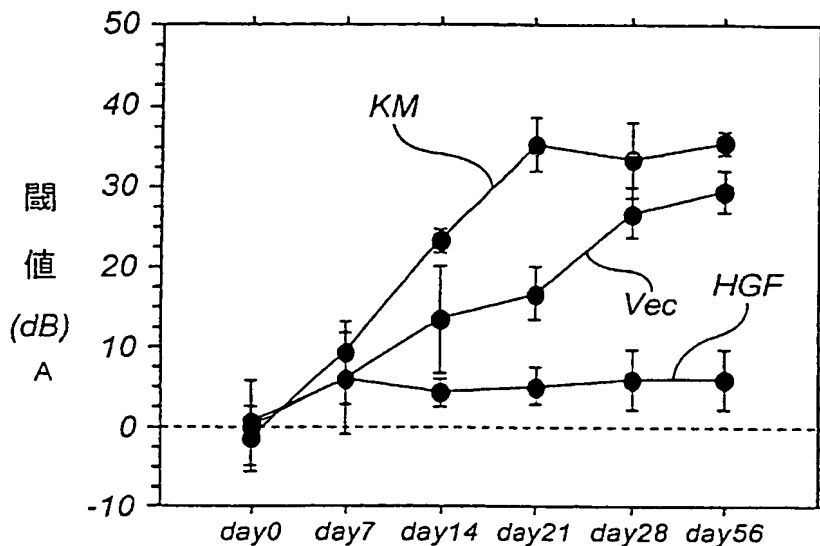
(72) 発明者; および  
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金田 安史  
 (KANEDA, Yasufumi) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府  
 箕面市 小野原東 6-1 2-8 Osaka (JP). 大島 一  
 男 (OSHIMA, Kazuo) [JP/JP]; 〒562-0025 大阪府 箕  
 面市 粟生外院 1-19-21-302 Osaka (JP). 森下 竜一  
 (MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府 大  
 阪市 淀川区宮原 2-1 1-2 2-5 0 2 Osaka (JP). 久  
 保 武 (KUBO, Takeshi) [JP/JP]; 〒657-0016 兵庫県 神  
 戸市 灘区篠原台 2 0-8 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 古谷 聡, 外 (FURUYA, Satoshi et al.); 〒103-  
 0007 東京都 中央区 日本橋浜町 2-1 7-8 浜町花長  
 ビル 6 階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: DRUG FOR AUDITORY DYSFUNCTION

(54) 発明の名称: 聴覚機能障害用医薬



A...THRESHOLD (dB)

(57) Abstract: It is intended to provide a drug for auditory dysfunction which is appropriately usable in gene therapy for auditory dysfunction. Namely, a drug for auditory dysfunction which contains as the active ingredient a hepatocyte growth factor (HGF) gene or a virus envelope vector having its plasmid enclosed therein. This drug is appropriately usable particularly as a gene therapeutic for preventing or treating auditory disturbance.

(57) 要約: 本発明は、聴覚機能障害の遺伝子治療用として適した聴覚機能障害用医薬を提供する。すなわち、肝実  
 質細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子、又はそのプラスミドを封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分とし  
 て含有する、聴覚機能障害用医薬である。特に難聴の予防、治療を目的とする遺伝子治療用

[続葉有]



WO 2004/030702 A1



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

03059PCT

原本 (出願用) - 印刷日時 2003年10月02日 (02. 10. 2003) 木曜日 09時53分16秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01. 07. 2003)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	03059PCT
I	発明の名称	聴覚機能障害用医薬
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4a	名称	アンジェス エムジー株式会社
II-4en	Name	ANGES MG, INC.
II-5a	あて名:	560-0082 日本国 大阪府 豊中市 新千里東町一丁目四番二号
II-5en	Address:	1-4-2, Shinsenri-Higashimachi, Toyonaka-shi, Osaka 560-0082 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	06-4863-9545
II-9	ファクシミリ番号	06-4863-9546
III-I	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-1-4j	氏名 (姓名)	金田 安史
III-1-4e	Name (LAST, First)	KANEDA, Yasufumi
III-1-5j	あて名:	562-0031 日本国 大阪府 箕面市 小野原東 6-12-8
III-1-5e	Address:	6-12-8, Onoharahigashi, Minoh-shi, Osaka 562-0031 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

III-2	その他の出願人又は発明者	
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-2-4j a	氏名(姓名)	大島 一男
III-2-4e n	Name (LAST, First)	OSHIMA, Kazuo
III-2-5j a	あて名:	560-0021 日本国 大阪府 豊中市 本町7-1-15-403
III-2-5e n	Address:	7-1-15-403, Honmachi, Toyonaka-shi, Osaka 560-0021 Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
III-3	その他の出願人又は発明者	
III-3-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-3-4j a	氏名(姓名)	森下 竜一
III-3-4e n	Name (LAST, First)	MORISHITA, Ryuichi
III-3-5j a	あて名:	532-0003 日本国 大阪府 大阪市 淀川区宮原2-11-22-502
III-3-5e n	Address:	2-11-22-502, Miyahara, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka 532-0003 Japan
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP
III-4	その他の出願人又は発明者	
III-4-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-4-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-4-4j a	氏名(姓名)	久保 武
III-4-4e n	Name (LAST, First)	KUBO, Takeshi
III-4-5j a	あて名:	657-0016 日本国 兵庫県 神戸市 灘区篠原台20-8
III-4-5e n	Address:	20-8, Shinoharadai, Nada-ku, Kobe-shi, Hyogo 657-0016 Japan
III-4-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-4-7	住所(国名)	日本国 JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

03059PCT

原本 (出願用) - 印刷日時 2003年10月02日 (02. 10. 2003) 木曜日 09時53分16秒

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名 (姓名)	古谷 聡
IV-1-1en	Name (LAST, First)	FURUYA, Satoshi
IV-1-2ja	あて名:	103-0007 日本国 東京都 中央区 日本橋浜町2-17-8
IV-1-2en	Address:	浜町花長ビル6階 Hamacho-Hanacho Building 6th Floor, 2-17-8, Nihonbashi-Hamacho, Chuo-ku, Tokyo 103-0007 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3663-7808
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3639-0419
IV-1-5	電子メール	mizobe@gol.com
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	溝部 孝彦
IV-2-1en	Name (s)	MIZOBE, Takahiko
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

03059PCT

原本 (出願用) - 印刷日時 2003年10月02日 (02. 10. 2003) 木曜 09時53分16秒

V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	出願日	2002年10月02日 (02. 10. 2002)	
VI-1-2	出願番号	特願2002-289639	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て (米国を指定国とする場合)	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書 (申立てを含む)	5	-
IX-2	明細書 (配列表を除く)	15	-
IX-3	請求の範囲	1	-
IX-4	要約	1	EZABST00. TXT
IX-5	図面	3	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数 (明細書の配列表を除く)	25	
IX-6	明細書の配列表	5	-
IX-7	合計	30	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-13	優先権証明書	優先権証明書 VI-1	-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表		
IX-16 (i)	規則13の3に基づき提出する国際調査のための写し (国際出願の一部を構成しない)	-	1 フレキシブルディスク
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
IX-18	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-

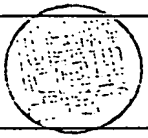
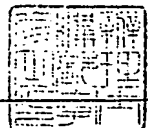
陳述書

フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

03059PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2003年10月02日 (02. 10. 2003) 木曜日 09時53分16秒

TX-19	要約書とともに提示する図の番号	
TX-20	国際出願の使用言語名:	日本語
X-1	提出者の記名押印	
X-1-1	氏名 (姓名)	古谷 聡
X-2	提出者の記名押印	
X-2-1	氏名 (姓名)	溝部 孝彦

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

## 明細書

### 聴覚機能障害用医薬

#### 発明の属する技術分野

本発明は、遺伝子治療等に用いられる、難聴のような聴覚機能障害の予防薬、治療乃至は改善薬として好適な聴覚機能障害用医薬に関する。

#### 従来技術

聴覚障害は、人間にとって最も一般的な感覚欠損であり、10人中1人以上が罹患すると言われている。聴覚障害は、例えばアミノグリコシド系抗生物質やシスプラチン（CDDP）のような耳毒性薬剤、騒音及び加齢を含む様々な要素によって引き起こされる可能性がある。

これらの要素は、聴覚シグナルを収集し、聴覚ニューロンを介して脳に転送する聴覚細胞として機能するコルチ器内の内耳有毛細胞に影響を及ぼす。更に、感覚有毛細胞の喪失に続発して聴覚神経の変性が発生し、聴覚の機能障害が悪化するものと考えられる。

一般に、哺乳類脊椎動物における有毛細胞及び聴覚ニューロンは、新しい有毛細胞及びニューロンを産生する出生後の細胞有糸分裂能力を有していない。哺乳類平衡聴覚上皮では、*in vivo* 前庭受容体については低レベルの再生が可能である。しかし、*in vitro* の新生児マウス蝸牛において極めて限定された再生が観察されたことを除いて、*in vivo* での聴覚感覚上皮の再生は観察されていない。

重度の難聴を治療する目的で、人工内耳が患者にとって大きな利益を提供し、効果的に関与することは証明されているが、人工内耳の利点を享受できるかどうかは聴覚神経集団の質及び量に左右され、聴覚神経集団の消失は聴覚上の利点を



大きく低下させる。

これまでに実施された試験で、刺激に利用できる生存聴覚ニューロンの総数と人工内耳を装着した被験者の聴力との間に明確な関係があることが証明されており、これは、人工内耳が必ずしも満足できる結果を生み出せないことを示している。

このため、人工内耳の有効性を高めるには、聴覚ニューロンを保存又は再生する治療方法を開発することが不可欠である。近年の試験では、例えば神経成長因子 (NGF: nerve growth factor)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF: Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor)、脳由来成長因子 (BDNF: brain-derived neurotrophic factor)、ニューロトロフィン-3 (NT-3: neurotrophic factor-3) 及び NT-4/5 のような多数の神経栄養因子が螺旋神経節細胞 (S G C s) を含む内耳聴覚ニューロンの生存に影響を及ぼすことが証明されている。

本発明に関連する先行技術である US-A 6, 136, 785 には、脊椎動物に成長因子又はその混合物を投与することによって、アミノグリコシドのような耳毒性薬剤により引き起こされる損傷から内耳の感覚毛細胞を保護する方法が開示されている。その他の関連する先行技術としては、WO-A 98/00014、US-B 6, 017, 886、JP-A 2002-503687 等が知られている。

## 発明の開示

本発明は、聴覚ニューロンを保存又は再生することで、聴覚機能障害を予防、治療等できる聴覚機能障害用医薬を提供することを課題とする。

本発明者は、肝細胞増殖因子 (HGF; Hepatocyte Growth Factor) 遺伝子が聴覚障害を治癒させることに有効な治療物質であることに注目し、研究を重ね、本発明を完成した。

請求項 1 の発明は、課題の解決手段として、肝実質細胞増殖因子 (HGF) 遺

伝子を有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬を提供する。

請求項 2 の発明は、課題の他の解決手段として、肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬を提供する。

請求項 3 の発明は、課題の他の解決手段として、肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子、又はそのプラスミドを封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬を提供する。

請求項 4 の発明は、課題の他の解決手段として、ウイルスが、センダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルスから選ばれる 1 種である、請求項 3 記載の聴覚機能障害用医薬を提供する。

本発明の聴覚機能障害用医薬は、聴覚機能障害の予防薬、聴覚機能障害の治療又は症状の改善薬として適しており、特に難聴のための遺伝子治療用医薬として適している。

本発明は肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドの聴覚機能障害用医薬を製造する用途または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドの治療に有効な量を聴覚機能障害を有する患者に投与することによる聴覚機能障害を治療する方法を提供する。

本発明でいう「肝実質細胞増殖因子（HGF）」は、様々な薬理作用を示す配列表の配列番号 1 で示される生理活性ペプチドであり、その薬理作用については、例えば、実験医学 Vol. 10, No. 3（増刊）330-339 (1992) に記載されており、WO-A 97/7824 においても、従来技術として様々な用途が記載されているが、聴覚機能障害に対する薬理作用については、全く知られていない。

## 発明の詳細な説明

本発明の聴覚機能障害用医薬に有効成分として含有される肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子は、HGFを発現できる遺伝子をいい、具体的には配列表の配列番号2で示される。この遺伝子には、発現されるポリペプチドがHGFと実質的に同じ効果を奏する限り、その遺伝子配列の一部が欠失したり、他の塩基により置換されていたり、他の塩基配列が一部挿入されていたり、5'末端及び／又は3'末端に塩基が結合したりしたような遺伝子も包含される。

このようなHGF遺伝子としては、Nature, 342, 440 (1989), JP-A 5-111383、WO-A 90/10651, Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989) 等に記載のHGF遺伝子を用いることができる。

HGF遺伝子は、適当なベクター、好ましくはHGF遺伝子をプラスミドに組み込んだものを用いることができる。

HGF遺伝子は、RNAを取り除いたウイルスの膜（ウイルスエンベロープ）にHGF遺伝子を封入したもの、又はHGF遺伝子をプラスミドに組み込んだものを封入したウイルスエンベロープベクターを用いることができる。

ここで用いるウイルスは、野生型ウイルスであっても、組み替え型ウイルスであっても良い。このウイルスとしては、センダイウイルス（HVJ）、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルスから選ばれる1種が好ましい。これらの中でも、HVJがより好ましく、特に不活性化HVJが好ましい。この不活性化とは、ゲノムを不活性化したウイルスである。

なおセンダイウイルスとして具体的には、例えばVR-105, VR-907等をP. O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA 在のAmerican Type Culture Collection (ATCC), telephone 1-703-365-2700 から購入することができる。

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,152376>, VR-

105&text=Sendai&max=20

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,1375478,VR-907&text=Sendai&max=20>

ウイルスエンベロープベクターとしては、WO-A 01/57204 に開示されたH V J エンベロープベクターを用いることができる。

本発明の聴覚機能障害用医薬の剤型は、投与方法との関連において決定されるが、本発明においては注射薬とすることが好ましい。

本発明の聴覚機能障害用医薬を注射薬とするときは、H G F 遺伝子、H G F 遺伝子のプラスミド、又は肝実質細胞増殖因子（H G F）遺伝子、又はそのプラスミドを封入したウイルスエンベロープベクターと、薬学的に受容可能なキャリア（滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、緩衝液等）とを混合することで製造できる。

キャリアには、等張性及び化学的安定性を増強する物質のような微量の添加物を適宜含有させることができる。このような物質は、使用された投薬量及び濃度において、患者に対して非毒性であるものである。

このような物質としては、リン酸、クエン酸、コハク酸、酢酸、その他の有機酸又はこれらの塩のような緩衝剤；アスコルビン酸のような抗酸化剤；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド（例えば、ポリアルギニン又はトリペプチド）；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、イムノグロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン）；単糖、二糖及び他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、蔗糖、デキストリン、セルロース又はその誘導体）；キレート剤（例えば、E D T A）；糖アルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）；対イオン（例えば、ナトリウム）；非イオン界面活性剤（例えば、ポリソルベート、ポロキサマー）；ポリエチレングリコール等を挙

げることができる。

本発明の聴覚機能障害用医薬を注射薬とするときは、密封アンプル又はバイアルにより、乾燥体および溶解液として別々に、あるいは水溶液として保存する。

本発明の聴覚機能障害用医薬を人に投与するときの投与部位は、例えば注射薬の場合、内耳内に蝸牛経由で直接投与する方法、内耳内に半規管経由で直接投与する方法、脳脊髄液内に投与し、内耳へ伝達させる方法、中耳内に投与し、内耳へ浸潤させる方法、人工内耳挿入手術の際に挿入電極に付着させる、又は除放させる装置を組み込み、内耳内へ直接投与する方法等を適用できる。

本発明の聴覚機能障害用医薬は、医療実施基準に一致した様式で、個々の患者の臨床状態（例えば、予防又は処置されるべき状態）、投与方法、投与部位、投与計画及び当業者に公知の他の因子を考慮しつつ処方され、投与される。従って、本発明の聴覚機能障害用医薬の有効量又は適切な投与量は、このような考慮事項によって決定する。

本発明の聴覚機能障害用医薬の人への投与量は、ウイルスエンベロープベクターを投与する場合、患者の体重1 kg 当たり、通常0.001  $\mu$ g $\sim$ 1 g、好ましくは0.01  $\mu$ g $\sim$ 500 mg、より好ましくは0.1  $\mu$ g $\sim$ 100 mgのウイルスエンベロープベクターを投与する。

投与されるウイルスエンベロープベクター中のHGF遺伝子の量は、患者の体重1 kg 当たり、通常0.01  $\mu$ g $\sim$ 500 mg、好ましくは0.1  $\mu$ g $\sim$ 10 mg、より好ましくは1  $\mu$ g $\sim$ 1 mgである。

本発明の聴覚機能障害用医薬は、聴覚機能障害の遺伝子治療用医薬として用いることができ、聴覚機能障害用の予防薬、治療又は症状改善薬として適しており、聴覚機能障害の内、特に難聴用の予防薬、治療又は症状改善薬として適している。

我々は本研究において、ヒト HGF を含む HVJ-E のクモ膜下脳脊髄液中への注入が、アポトーシス抑制により有毛細胞および螺旋神経節細胞の喪失を予防するこ

とを示した。

すなわち、HGF 遺伝子をカナマイシン処置直前に投与することにより聴覚障害を予防することができ、またカナマイシンによる聴覚障害惹起後でも聴覚機能が回復した。

これらの結果は、HVJ-E ベクターを用いる HGF 遺伝子治療の、極めて高い有用性を示している。

内耳への遺伝子移入に関しては、基本的に4つの外科的手法が行われている。

- i) 蝸牛切開術による、蝸牛中への直接注射
- ii) 膜を通した注射あるいは、ベクターを含むジェル (gel) 小片を無傷の膜上に置き浸透させることによる、正円窓膜を通じての投与
- iii) 切開術による、後半規管を通しての内耳内投与
- iv) 内リンパ嚢中への投与

これまでアデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のいくつかのウイルスベクターは、上記4つの手法のいずれかを用い、内耳内に直接投与されてきた。

しかしながらそれぞれの手法は、侵襲性および有効性の観点から、それぞれ利点および欠点を有している。

我々は本研究において、蝸牛への直接注射による内耳への侵襲を避けるため、HVJ-E ベクターをクモ膜下脳脊髄液中に注射した。

この方法により、脳脊髄液中における導入遺伝子の発現を酵素活性および免疫染色により確認し、また脳あるいは耳組織内において有意な損傷を認めなかった。この事実は、HVJ-E ベクターそのものが、クモ膜下脳脊髄液への投与後、内耳内螺旋神経節細胞に到達したことを示唆しており、クモ膜下脳脊髄液から内耳への、いくつかの可能性ある経路が示された。

ベクターを膜内に注入した際、離れた器官において、いかなるルシフェラーゼ

活性も観察されなかったので、クモ膜下脳脊髄液から内耳に到達する最もあり得る経路は、蝸牛管経由だと考えられる。

仮にベクターが血流経路で全身に広まったのであれば、静注後ルシフェラーゼ活性はまず脾臓において認められるので、脾臓や肺のような離れた器官においても導入遺伝子の発現が検出されるはずである。

従来 NGF, BDNF, GDNF and NT-3 等の向神経因子が、聴覚の治療に用いられてきた。

しかしながら、これまで HGF はこの目的には用いられてこなかった。

肝臓への効果に加え、海馬、大脳皮質、知覚ニューロン、運動ニューロン等において HGF は向神経活性を示すことが明らかになっているが、今回我々は、ヒト HGF が、クモ膜下脳脊髄液および螺旋神経節細胞の相方に認められ、それがラットの内因性 HGF を誘導したことを示した。

聴覚系への HGF 遺伝子治療は、ニューロトロフィンを利用する従来の遺伝子治療法に勝るいくつかの利点を有すると思われる。

また人工内耳と HGF 遺伝子治療の併用、すなわち人工内耳手術中に HGF 遺伝子を投与することも効果的であろう。

聴覚障害は有毛細胞および螺旋神経節細胞の喪失を伴い、これらの喪失予防はアポトーシスによる細胞死に対する HGF の保護作用によりなされる。

HGF の発現は、カナマイシン処置による聴覚障害惹起後の機能回復にも効果的であった。

このように、知覚神経性の聴覚障害治療にあたり、HGF 遺伝子治療は可能性の高い方法の一つである。

本研究は、HGF 遺伝子と HVJ-E ベクター送達システムの組み合わせにより、聴覚障害治療のための新たな知見と手法を与えるものである。

本発明の聴覚機能障害用医薬は、特に難聴の予防、治療等を目的とした遺伝子

治療用の医薬として好適である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例の聴覚機能試験における聴覚機能の経日変化を示すグラフである。

図2は、実施例の聴覚機能試験における聴覚機能の経日変化を示すグラフである。

図3 aは無傷の螺旋神経節細胞の顕微鏡写真、図3 bはカナマイシン処置群の顕微鏡写真、図3 cはカナマイシン+HGF処置群の顕微鏡写真である。

図4は、カナマイシン+HGF処置群とカナマイシン+ベクター処置群における、螺旋神経節細胞密度を示すグラフである。

図5は、カナマイシン+HGF処置群とカナマイシン処置群における、螺旋神経節細胞密度を示すグラフである。

#### 実施例

以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

##### プラスミドDNAの調製

pCMV-lacZ (9.2 kb) は、pSV- $\beta$ -ガラクトシダーゼ (Promega Corp.、マディソン、ワイオミング州、アメリカ) のHindIII-BamHIフラグメントを、pcDNA3 (5.4 kb) (インビトロゲン、サンディエゴ、カリフォルニア州、アメリカ) 内へ、HindIII-BamHI部位で挿入することによって構築した。

pCMV-ルシフェラーゼ-GL3 (pLuc-GL3: 7.4 kb) は、pGL3ベーシックベクター (プロメガ) からのルシフェラーゼ遺伝子をpcD



NA3（インビトロゲン）内にクローニングすることによって構築した。

pVAX1-hHGF（5.2 kb）は、ヒトHGF cDNAをpVAX1（3.0 kb）（インビトロゲン）内にBamHI及びNotI部位で挿入することによって構築した。

プラスミド類は、キアゲン・プラスミド単離キット（キアゲン、ヒルデン、ドイツ）を用いて精製した。

#### HVJ-エンベロープベクターの調製

センダイウイルス（HVJ；Hemagglutinating virus of Japan）エンベロープベクター（HVJ-E）は、W0-A 01/57204 の実施例8に準じて、プラスミドDNAを不活化HVJ粒子内に組み込むことによって調製した。但し、HVJは遠心分離により精製し、紫外線照射により不活性化した。

#### HVJ-E懸濁液（本発明の聴覚機能障害用医薬）の調製

10,000赤血球凝集単位であるUV不活化HVJ（Z菌株）を、200  $\mu$ gのプラスミドDNA及び0.3%トライトンXと混合し、平衡生理食塩液（BSS：137mMのNaCl、5.4mMのKCl、10mMのTris-HCl、pH7.6）を用いて洗浄し、クモ膜下注入のためにBBSを用いて100  $\mu$ Lに調製した。本実施例では、pCMV-lacZ、pCLuc-GL3、pVAX1-hHGF、pCDNA3又はpVAX1プラスミドDNAを含有するHVJ-Eを使用した。

#### 実験動物及び処置群

正常なプライエル反射を示すSprague-Dawley系雄性ラット（6週齢；体重200～210g）を日本Charles River社から入手した。すべての処置は、大阪大学実験動物委員会ガイドラインに従って実施した。

動物は、保護群、救済群、保護／救済群、ベクター対照群及び非処置群の5つの群に分けた。全群の動物は、アミノグリコシド中毒によって両耳の聴覚を喪失

させ、硫酸カナマイシン（明治製菓、東京）を連続14日間に渡り、皮下注射（400mg/kg/日）によって投与した。

保護群及び保護／救済群には、カナマイシン処置の初日にhHGF遺伝子（pVAX1-hHGF）を含有するHVJ-E懸濁液をクモ膜下注入した。

ベクター対照群には、上記と同一方法でクモ膜下注入により、対照ベクター（pVAX1）を含有するHVJ-E懸濁液を投与した。

救済群及び保護／救済群には、カナマイシン処置の最終日（第14日）にpVAX1-hHGFを含有するHVJ-Eを注入した。

更に、組織化学的解析及びルシフェラーゼ定量のため、pCMV-lacZ又はpLuc-GL3を含有するHVJ-Eを動物に投与した。

このような処置後、トランスフェクション7日後に $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現を観察し、トランスフェクションの1日後にルシフェラーゼ活性を測定した。

#### クモ膜下腔への in vivo 遺伝子導入

本試験では、CNS及び内耳内への in vivo 遺伝子導入法として、HVJ-Eの注入を使用する小脳延髄槽内への遺伝子導入法を実施した。

クモ膜下腔内へ注入するために、ケタミン（三共、日本）及びキシラジン（バイエル）を用いて動物に麻酔をかけた後、各動物の頭部を腹臥位で固定し、後頭脳正中線切開部を通して環椎後頭膜を露出させた。

ステンレス製カニューレ（27ゲージ；ベクトン・ディッキンソン）を小脳延髄槽（クモ膜下腔）内へ挿入し、カニューレの位置を確認して、脳内圧上昇を回避するために脳脊髄液（100 $\mu$ L）を取り出した後、マーカー遺伝子、hHGF遺伝子又は対照ベクターを含有するHVJ-E（100 $\mu$ L）を50 $\mu$ /minの速度で注入した。

その後30分間は、動物の頭部を下に向けておいた。投与後に体重減少、活動低下又は行動変化を示したラットはいなかった。

### ルシフェラーゼ活性についての定量

ルシフェラーゼ遺伝子がトランスフェクトされたラットを、トランスフェクション24時間後に麻酔下で屠殺した。器官（脳、肺、脾臓、肝臓及び蝸牛）を採取し、個別に50 mL ファルコンチューブ内に入れた。

ルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼ・アッセイキット（プロメガ）を用いて測定した（44 of HVJ-E）。組織抽出物のタンパク質濃度を測定することによってルシフェラーゼレベルを標準化した（44 of HVJ-E）。ルシフェラーゼ単位は、組織タンパク質1 g当たりの相対発光量（RLU）として表した。

### 脳脊髄液中のヒトHGFについての酵素免疫測定法

本試験には、hHGF遺伝子を含有するHVJ-Eの注射の5日及び14日後にラットから採取した脳脊髄液（CSF）（100  $\mu$ L）を使用した。

CSF中のヒトHGF及びラットHGFの濃度は、抗ヒト及び抗ラットHGF抗体を使用するエンザイムイムノアッセイによってアッセイキットの製造業者（免疫研究所、東京）の取扱説明書に従って測定した。

ヒトHGFに対する抗体は、ヒトHGFとのみ反応し、ラットHGFとは反応しなかった。ラットHGFに対する抗体は、ヒト及びラットHGFの両方と反応した。

### 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

エーテルを用いてラットに深い麻酔をかけ、断頭し、側頭骨を低温リボヌクレアーゼ無含有生理食塩液中に入れた。耳嚢を除去し、解剖顕微鏡下で全蝸牛を単離した。ラットからの組織を溶解緩衝液中にプールし、ホモジナイザーを使用してホモジナイズし、RNeasy Mini Kit（キアゲン）を使用して全RNAを単離した。RT-PCR用のSuperScript第1鎖合成システム（インビトロゲン）を用いてRNAを逆転写させた。

ヒトHGF及びGAPDHに対する特異的プライマー：HGF、上流プライマー5'-TTCACAAGCAATCCAGAGGTACGC-3'、下流プライマー5'-GAGGGTCAAGAGTATAGCACCATG-3'；GAPDH、上流プライマー5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3'、下流プライマー5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'（以上それぞれ配列表の配列番号3、4、5および6）を使用して、第1鎖cDNAを増幅させた。

PCR条件は、各セットのプライマーに対して最適化した。PCR反応混合液は、5  $\mu$ LのcDNA、5  $\mu$ Lの10 $\times$ PCR緩衝液、4  $\mu$ Lの2.5mMのdNTP、2.5  $\mu$ Lの20 pM上流及び下流プライマー、及び1.5 UのTaqポリメラーゼを含有しており、45  $\mu$ Lとなるまで蒸留水を添加した。

加熱サイクル条件：HGF、94 $^{\circ}$ Cで45秒間、70 $^{\circ}$ Cで2分間及び72 $^{\circ}$ Cで2分間；GAPDH、94 $^{\circ}$ Cで45秒間、58 $^{\circ}$ Cで1分間及び72 $^{\circ}$ Cで2分間。

#### 聴覚機能の評価

聴覚機能の生理的状态を評価するために、聴性脳幹反応（ABR）聴力検査を実施した。

ABRsは、ベースライン値を測定するためにカナマイシン投与初日の前日に測定し、更にカナマイシン処置開始から7、14、21、28及び56日後に再度記録した。

聴覚機能の各試験前に、動物にはケタミン（50mg/kg）-キシランジン（10mg/kg）溶液の筋肉内注射により麻酔をかけた。針電極を同側右耳翼（参照電極）、対側耳翼（接地電極）及び頭頂（能動電極）の皮下に配置した。全記録は防音室にて、日本光電製Neuropack IV（MEM-4104）システムを用いて実施した。

単一波長100  $\mu$ secのクリック音（10/sec）によって電位を誘発し、こ

これらのモノラル刺激をラウドスピーカーによって右耳へ送達した。反応をデジタルフィルタリングし（バンドパス：50～3,000 Hz）、増幅させ、500回の反応を平均化した。

聴覚閾値及びP1波の待ち時間は、各前試験値との比較によって評価し、計算した。刺激強度は、閾値を測定するために2 dBずつ段階的に上昇させて変化させた。閾値は、反応再現性を確認するために連続2回の試験で反応を記録できる最低強度レベルであると定義されている。結果を図1、図2に示す。

図1は、0日から56日間の閾値（dB）であり、図2はI波潜時（mS）を示す。なお、図中のHGFは保護群、保護／救済群、救済群を示し、図中のVecはベクター対照群を示し、図中のKMは非処置群を示す。

図1、図2から明らかなとおり、保護群、保護／救済群、救済群は、56日経過後においても聴覚の変化（閾値及びI波潜時の変化）は僅かであったが、ベクター対照群と非処置群では、聴覚の変化（閾値及びI波潜時の変化）が顕著であった。

図3に、蝸牛（うずまき管）の螺旋神経節細胞（SGC）の光学顕微鏡写真を示す。図3 aは無傷の蝸牛のもの、図3 bはカナマイシン処置群（非処置群）のもの、図3 cはカナマイシン+HGF処置群（保護群、保護／救済群、救済群）のものである。

図3 a～cから明らかなとおり、カナマイシン+HGF処置群の螺旋神経節細胞は、カナマイシン処置群の比べると、無傷のものに近かった。

図4に、カナマイシン+HGF処置群（保護群、保護／救済群、救済群）とカナマイシン+ベクター処置群（ベクター対照群）における、螺旋神経節細胞密度（10,000 mm<sup>2</sup>当たりの細胞数）を示す。

図5に、カナマイシン+HGF処置群（保護群、保護／救済群、救済群）とカナマイシン処置群（非処置群）における、螺旋神経節細胞密度（10,000 m

m<sup>2</sup>当たりの細胞数)を示す。

図4、図5から明らかなとおり、カナマイシン+HGF処置群は、他の処置群に比べて、螺旋神経節細胞密度が高かった。

以上の結果は、HVJ-E懸濁液の投与により、聴覚ニューロンが保存又は再生された結果であると推定される。

## 請求の範囲

1. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子を有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬。
2. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬。
3. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子、又はそのプラスミドを封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬。
4. ウイルスが、センダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルスから選ばれる1種である、請求項3記載の聴覚機能障害用医薬。
5. 聴覚機能障害が難聴である、請求項1～4のいずれか1項記載の聴覚機能障害用医薬。
6. 聴覚機能障害の予防薬である、請求項1～5のいずれか1項記載の聴覚機能障害用医薬。
7. 聴覚機能障害の治療又は改善薬である、請求項1～5のいずれか1項記載の聴覚機能障害用医薬。
8. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドの聴覚機能障害用医薬を製造する用途。
9. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子または肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子のプラスミドの治療に有効な量を聴覚機能障害を有する患者に投与することによる聴覚機能障害を治療する方法。

## 要約書

本発明は、聴覚機能障害の遺伝子治療用として適した聴覚機能障害用医薬を提供する。すなわち、肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子、又はそのプラスミドを封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する、聴覚機能障害用医薬である。特に難聴の予防、治療を目的とする遺伝子治療用医薬として適している。



図 1

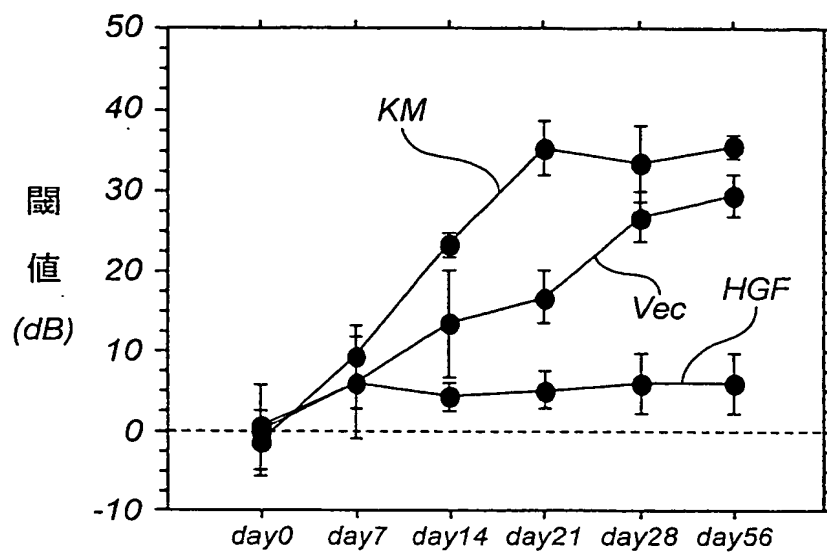
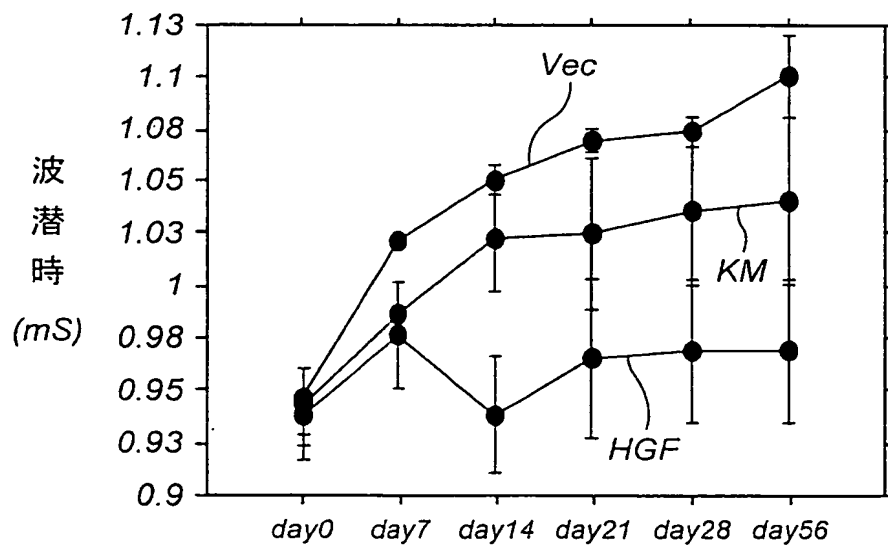


図 2



☒ 3

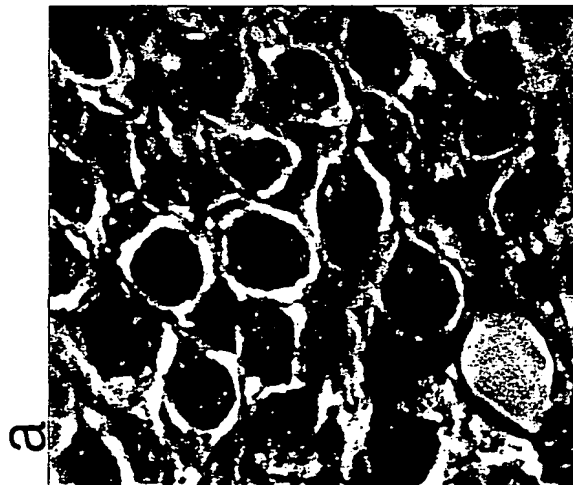
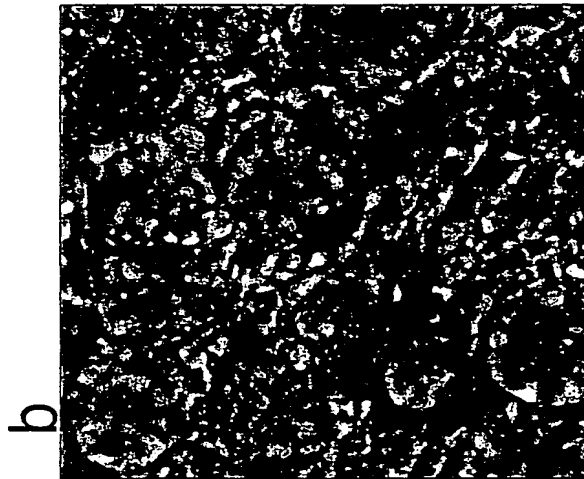
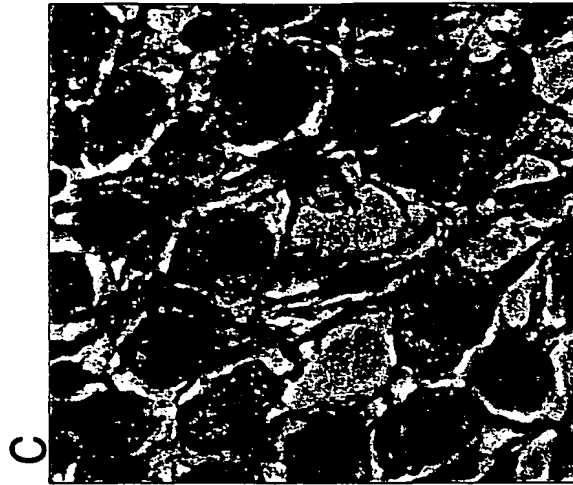


図 4

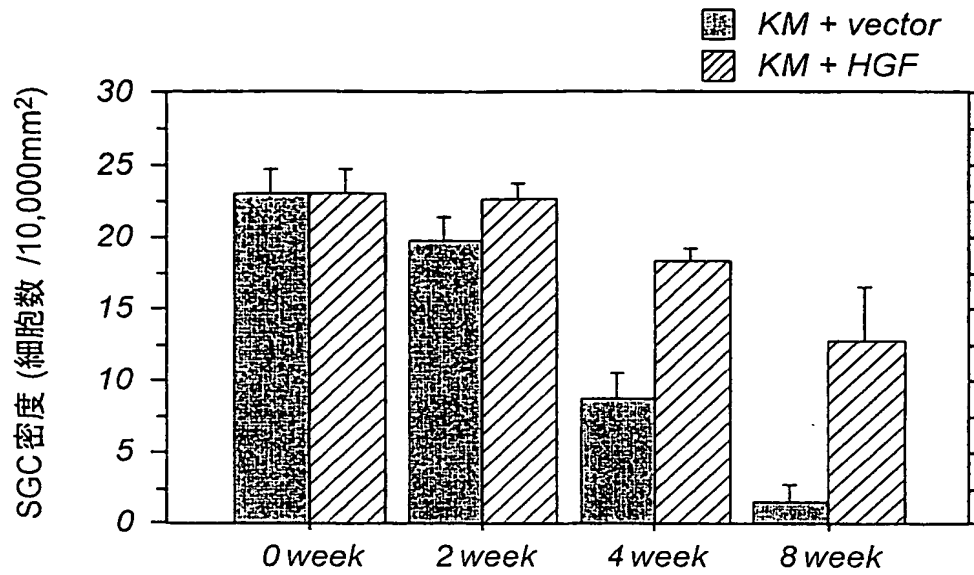
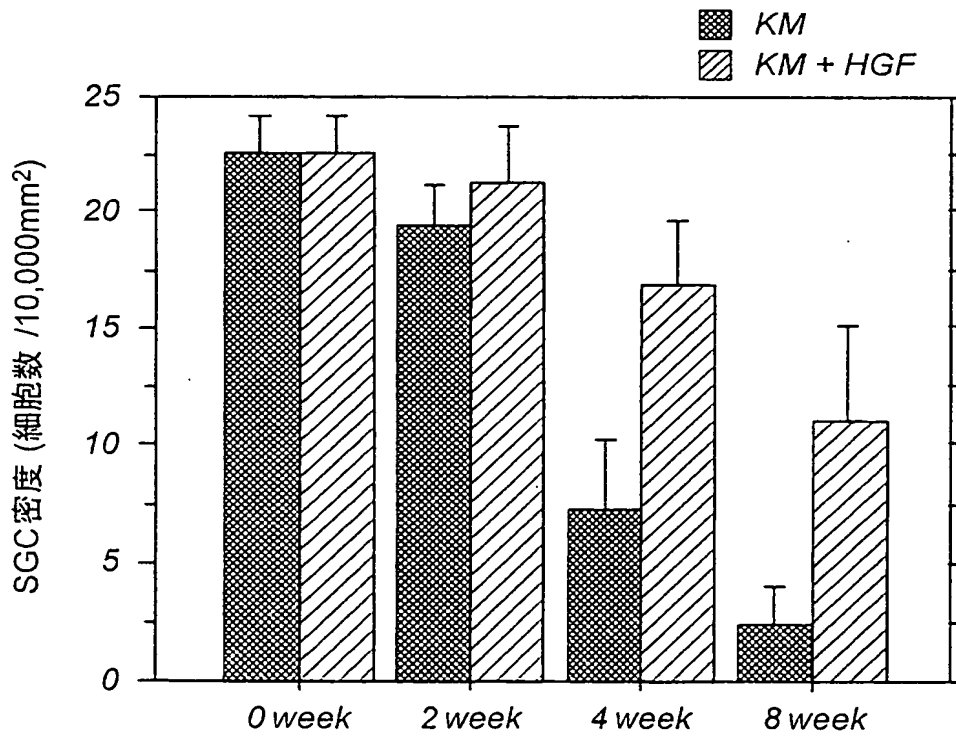


図 5



# SEQUENCE LISTING

<110> AnGes MG, Inc.

<120> Medicine to impediment to auditory functioning

<130> 03059PCT

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 728

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

```

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
 1             5             10             15
Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
      20             25             30
Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
      35             40             45
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
      50             55             60
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 65             70             75             80
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
      85             90             95
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
      100            105            110
Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
      115            120            125
Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
      130            135            140
Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145            150            155            160
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
      165            170            175
Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
      180            185            190
Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
      195            200            205

```

Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met	Asp	210	215	220
His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Ile	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	His	Gln	Thr	Pro	225	230	235
His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe	Asp	245	250	255
Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr	260	265	270
Thr	Leu	Asp	Pro	His	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr	Cys	275	280	285
Ala	Asp	Asn	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Thr	Glu	290	295	300
Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Asn	Thr	Ile	305	310	315
Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Glu	325	330	335
His	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu	Asn	340	345	350
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	355	360	365
Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	370	375	380
Met	Ser	His	Gly	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Met	385	390	395
Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp	Asp	405	410	415
Lys	Asn	Met	Glu	Asp	Leu	His	Arg	His	Ile	Phe	Trp	Glu	Pro	Asp	Ala	420	425	430
Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala	His	435	440	445
Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Pro	Trp	Asp	Tyr	Cys	450	455	460
Pro	Ile	Ser	Arg	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Val	Asn	Leu	465	470	475
Asp	His	Pro	Val	Ile	Ser	Cys	Ala	Lys	Thr	Lys	Gln	Leu	Arg	Val	Val	485	490	495
Asn	Gly	Ile	Pro	Thr	Arg	Thr	Asn	Ile	Gly	Trp	Met	Val	Ser	Leu	Arg	500	505	510
Tyr	Arg	Asn	Lys	His	Ile	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Ser	Trp	515	520	525

Val	Leu	Thr	Ala	Arg	Gln	Cys	Phe	Pro	Ser	Arg	Asp	Leu	Lys	Asp	Tyr
530						535					540				
Glu	Ala	Trp	Leu	Gly	Ile	His	Asp	Val	His	Gly	Arg	Gly	Asp	Glu	Lys
545					550					555				560	
Cys	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Ser	Gln	Leu	Val	Tyr	Gly	Pro	Glu	Gly
		565						570						575	
Ser	Asp	Leu	Val	Leu	Met	Lys	Leu	Ala	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Asp	Asp
		580						585					590		
Phe	Val	Ser	Thr	Ile	Asp	Leu	Pro	Asn	Tyr	Gly	Cys	Thr	Ile	Pro	Glu
	595					600						605			
Lys	Thr	Ser	Cys	Ser	Val	Tyr	Gly	Trp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Asn
	610					615						620			
Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	Val	Ala	His	Leu	Tyr	Ile	Met	Gly	Asn	Glu
625					630					635				640	
Lys	Cys	Ser	Gln	His	His	Arg	Gly	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Glu	Ser	Glu
			645					650						655	
Ile	Cys	Ala	Gly	Ala	Glu	Lys	Ile	Gly	Ser	Gly	Pro	Cys	Glu	Gly	Asp
		660						665					670		
Tyr	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Glu	Gln	His	Lys	Met	Arg	Met	Val	Leu
	675						680					685			
Gly	Val	Ile	Val	Pro	Gly	Arg	Gly	Cys	Ala	Ile	Pro	Asn	Arg	Pro	Gly
	690					695					700				
Ile	Phe	Val	Arg	Val	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Trp	Ile	His	Lys	Ile	Ile
705					710					715					720
Leu	Thr	Tyr	Lys	Val	Pro	Gln	Ser								
				725											

<210> 2

<211> 2187

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

```

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180
acaaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt 240
ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360
aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta 420

```

```

tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccttggagtt ccatgatacc acacgaacac 480
agcttttttc ctctgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct 540
cgaggggaag aagggggacc ctgggttttc acaagcaatc cagaggtaac ctacgaagtc 600
tgtgacatct ctcaagtgtc agaagttgaa tgcatacctt gcaatgggga gagttatcga 660
ggctctcatg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca 720
caccggcaca aattcttggc tgaaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc 780
cgcaatcccg atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgacctca caccgcctgg 840
gagtactgtg caattaaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga tgttcctttg 900
gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcactgt caataccatt 960
tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagatc ctacagagca tgacatgact 1020
cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct 1080
gaatcaccct ggtgtttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt 1140
ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg 1200
ggcaacttat cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa 1260
gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320
cgaaatccag atgatgatgc tcatggacct tgggtctaca cgggaaatcc actcattcct 1380
tgggattatt gccctatttc tcgtttgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta 1440
gaccatcccg taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaaa tgggattcca 1500
acacgaacaa acataggatg gatggttagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga 1560
ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac 1620
ttgaaagatt atgaagcttg gcttgggaatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680
tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctgggt 1740
ttaatgaagc ttgccaggcc tgctgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800
aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg gggctacact 1860
ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920
aaatgcagcc agcatcatcg aggggaaggtg actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg 1980
gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggccact tgtttgtgag 2040
caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttcctg gtcgtggatg tgccattcca 2100
aatcgtcctg gtatttttgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataca caaaattatt 2160
ttaacatata aggtaccaca gtcatag 2187

```

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA

<400> 3

TTCACAAGCA ATCCAGAGGT ACGC

20

<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA  
<400> 4  
GAGGGTCAAG AGTATAGCAC CATG  
20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA  
<400> 5  
TGAAGGTCGG AGTCAACGGA  
20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence Synthetic DNA  
<400> 6  
GATGGCATGG ACTGTGGTCA  
20